



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali
Corso di Laurea Magistrale in Produzioni Agroalimentari e Gestione degli
Agroecosistemi

Effetti dell'eccesso di boro in tre genotipi di *Ocimum basilicum* L.

Tesi di Laurea Magistrale

Candidato

Giacomo Passalacqua

Relatore

Prof.ssa **Lucia Guidi**

Correlatore

Prof. **Alberto Pardossi**

Anno accademico 2015/2016

INDICE

1.	Capitolo 1 Ruolo del boro nella nutrizione minerale delle piante	1
1.1.	I nutrienti del terreno	1
1.2.	Nutrienti non minerali	1
1.3.	Nutrienti minerali	2
1.3.1.	Macro-nutrienti	2
1.3.2.	Micro-nutrienti	2
1.4.	Tossicità dei micronutrienti	2
1.5.	Regolazione dell'assorbimento di nutrienti delle piante	3
1.5.1.	Meccanismi di assorbimento di acqua e ioni	3
1.6.	Canali dell'acqua	3
1.7.	Acquaporine delle piante	5
1.8.	Funzioni delle acquaporine	5
1.9.	Canali ionici e trasportatori	5
1.9.1.	Canali ionici	6
1.9.2.	Trasportatori ionici (Carrier)	7
1.10.	Il microelemento Boro	8
1.10.1.	Presenza di boro e reazioni nel suolo	8
1.10.2.	Il contenuto di boro nelle piante	10
1.10.3.	Contenuto di boro nell'acqua di irrigazione e sensibilità delle colture	10
1.11.	Sintomi visivi di tossicità da boro	10
1.12.	Tossicità da boro, effetti sul metabolismo delle piante	12
1.13.	Funzioni biochimiche del boro nelle piante	13
1.14.	Meccanismi di assorbimento del boro delle piante	14
1.15.	Trasportatori del boro	15
1.15.1.	Trasportatore NIP 5, 1	15
1.15.2.	NIP 6, 1	15
1.15.3.	BOR 1	16
1.15.4.	BOR 4	16
1.16.	Miglioramento genetico per aumentare la tolleranza all'eccesso di boro	17
1.16.1.	Carenza di boro	17
1.16.2.	Tossicità del boro	17
1.16.3.	Tolleranza delle colture al boro	17
2.	Capitolo 2 Caratteri botanici, biologia ed utilizzo del basilico	21
3.	Capitolo 3 Obiettivi del lavoro	24
4.	Capitolo 4 Materiali e metodi	26
4.1.	Materiale vegetale	26
4.2.	Condizioni di coltivazione	27
4.3.	Determinazione del peso fresco e secco delle piante	29
4.4.	Concentrazione di boro nelle foglie con metodo dell'azometrina-H	29
4.5.	Determinazione del contenuto di clorofille e carotenoidi	30

4.6.	Determinazione del contenuto di antociani	31
4.7.	Determinazione dell'attività dell'enzima ascorbato perossidasi	32
4.8.	Determinazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi	32
4.9.	Fluorescenza della clorofilla a	34
4.10.	Scambi gassosi delle foglie	34
4.11.	Valutazione dei sintomi di danno	35
4.12.	Analisi statistica	35
5	Capitolo 5 Risultati	36
5.1	Sintomi visibili sulla pianta	37
5.2	Effetti sulla biomassa delle piante	39
5.3	Concentrazione fogliare di boro	41
5.4	Fotosintesi	42
5.5	Pigmenti	44
5.5.1	Antociani	44
5.5.2	Clorofille e carotenoidi	45
5.6	Enzimi	46
6.	Capitolo 6 Discussione	48
7.	Capitolo 7 Bibliografia	51

Capitolo 1: Ruolo del boro nella nutrizione minerale delle piante

1.1. I nutrienti del terreno

Nel suolo possono essere trovate grandi quantità di minerali e materiali organici e alcuni di questi hanno una grande importanza per lo sviluppo anatomico e morfologico della pianta. La fertilità del suolo è un importante fattore di ordine agronomico. Essa è legata alla presenza degli elementi essenziali nel suolo, dal quale la pianta li assorbe in concentrazioni adeguate al metabolismo. I nutrienti presenti nel suolo in forma ionica possono interagire con il sistema radicale delle piante attraverso tre meccanismi: intercettazione radicale, diffusione e flusso di massa.

Gli elementi essenziali per le piante sono distinguibili in elementi non-minerali e minerali, quest'ultimi sono a loro volta suddivisi in macronutrienti e micronutrienti.

1.2. Nutrienti non minerali

I nutrienti non minerali sono idrogeno, ossigeno e carbonio. Questi elementi sono importanti per la formazione dei tessuti, sono presenti nella struttura di lipidi, carboidrati, proteine, acidi nucleici, e ormoni delle piante. L'idrogeno è l'elemento che contribuisce alla fissazione dell'azoto e alla fotosintesi, in virtù delle sue

proprietà riducenti. L'ossigeno viene estratto dall'atmosfera e dall'acqua, è utilizzato durante il processo di respirazione cellulare in cui lo zucchero derivante dal processo fotosintetico viene convertito in energia. Le piante catturano il carbonio presente nell'atmosfera sotto forma di anidride carbonica. Il carbonio è un nutriente organico necessario per lo svolgimento di tutti i cicli chimici, biologici e fisici e assicura inoltre le riserve energetiche durante la crescita vegetativa.

1.3. Nutrienti minerali

I nutrienti minerali sono suddivisi in macro- e micro-nutrienti

1.3.1. Macro-nutrienti

I macro nutrienti sono rappresentati da azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo. La presenza di questi elementi è necessaria in concentrazioni relativamente elevate negli organismi in modo da soddisfare l'attività fisiologica e lo sviluppo delle piante; essi giocano un ruolo fondamentale nella struttura delle piante.

1.3.2. Micro-nutrienti

I micronutrienti sono responsabili dell'attività regolatoria degli organelli cellulari; essi vengono assorbiti in concentrazioni minori rispetto ai macroelementi nei tessuti vegetali.

1.4. Tossicità dei micronutrienti

Nonostante la presenza dei microelementi sia necessaria per le piante, se essi sono presenti in concentrazioni superiori a quelle richieste dal fabbisogno della pianta si verificano frequentemente effetti tossici e negativi, quali la riduzione dei pigmenti fotosintetici, la minore integrità e permeabilità delle membrane, un aumento dello stress ossidativo dovuto alla produzione e all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS); inoltre si ha un aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti. Infine ad alte concentrazioni possono portare anche alla morte cellulare.

1.5. Regolazione dell'assorbimento di nutrienti delle piante

Generalmente per uno sviluppo ed una crescita ottimale delle piante sono sufficienti delle concentrazioni di elementi minerali relativamente basse; queste concentrazioni subiscono delle variazioni stagionali. Per far fronte alle forti variazioni delle concentrazioni di minerali nel suolo, le piante hanno sviluppato dei meccanismi per far sì che l'assunzione netta di un nutriente dipenda dalla necessità della pianta di questo elemento piuttosto che dalla sua concentrazione nell'ambiente radicale.

La membrana plasmatica delle cellule contiene un elevato numero di pori o canali, i quali sono specifici per acqua, ioni o alcune molecole e restrittivi per tutte le altre.

Questa selettività è dovuta alla presenza di proteine di trasporto transmembrana che sono alloggiate all'interno dei canali. Questi canali alternano conformazioni aperte e chiuse (gating) per regolare l'afflusso di acqua, ioni e altre molecole.

1.5.1. Meccanismi di assorbimento di acqua e ioni

I meccanismi di assorbimento di acqua nutrienti delle cellule viventi (piante incluse) è stato dettagliatamente spiegato dalla Royal Swedish Academy of Science nel suo "Information for the public, 8 ottobre, 2003" che ha portato nel 2003 alla vincita del premio Nobel per la chimica di Peter Agre e Roderick MacKinnon quali pionieri delle scoperte riguardanti i canali dell'acqua e degli ioni nelle cellule. La membrana plasmatica delle cellule contiene un elevato numero di pori o canali, i quali sono specifici per acqua, ioni o alcune molecole e restrittivi per tutte le altre (**Fig. 1**).

1.6. Canali dell'acqua

Il movimento dell'acqua attraverso i canali è controllato da proteine che prendono il nome di acquaporine (AQPs; **Fig. 2**), che consistono in una grande famiglia di proteine presente sia nell'eucarioti che nei procarioti.

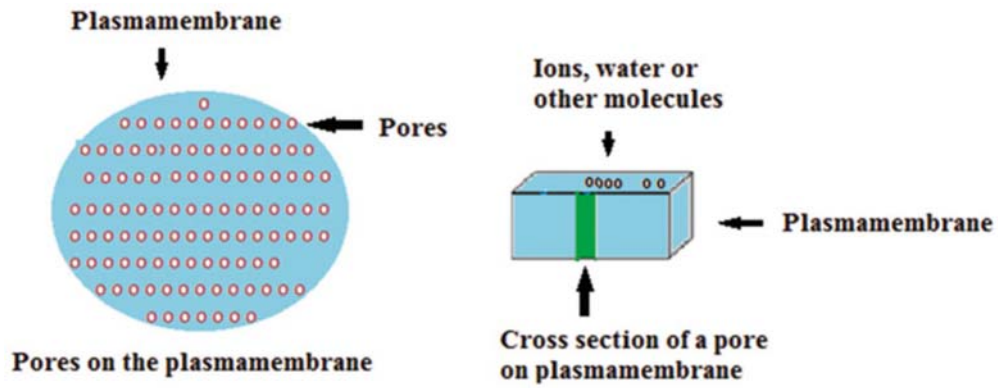


Figura 1. Rappresentazione dei pori (o canali) sulla membrana plasmatica. Immagine tratta da Mitra (2015).

La stretta selettività dei canali permette alle molecole d'acqua con la giusta orientazione di passare attraverso di essi e impedisce il passaggio a protoni o ioni ossonio a causa della loro carica positiva. Alle piccole molecole prive di carica come glicerolo e urea è consentito il passaggio attraverso i canali dell'acqua.

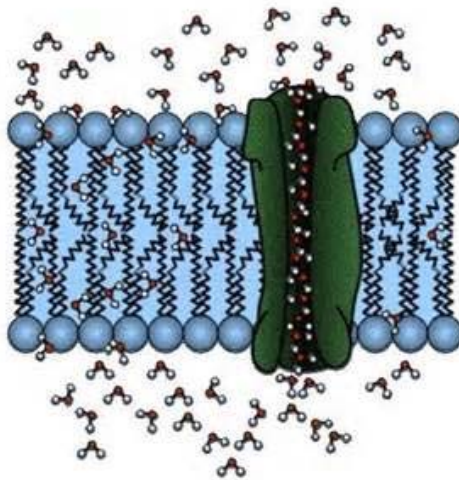


Figura 2. Rappresentazione delle acquaporine, proteine deputate al passaggio delle molecole di acqua attraverso le membrane. Immagine tratta da Verkman (2005).

1.7. Acquaporine delle piante

Le piante devono mantenere un equilibrio idrico sotto regimi idrici estremi quali la siccità e le inondazioni ed alle condizioni climatiche che coinvolgono variazioni di luce, di temperatura e di nutrienti. Di conseguenza il genoma delle piante contiene un elevato numero di geni delle acquaporine per facilitare e regolare il trasporto di acqua attraverso la membrana cellulare.

1.8. Funzioni delle acquaporine

Diversi report indicano che le funzioni delle acquaporine non sono esclusivamente legate al trasporto di acqua. Molecole quali glicerolo, urea, ammoniaca, altre molecole prive di carica ed eventualmente anche l'anidride carbonica possono passare attraverso membrane contenenti acquaporine (Quigley et al. 2002).

1.9. Canali ionici e trasportatori

Molti dei canali sulla membrana plasmatica sono sviluppati per consentire il passaggio di uno ione specifico o una molecola e non di altri (**Fig. 3**).

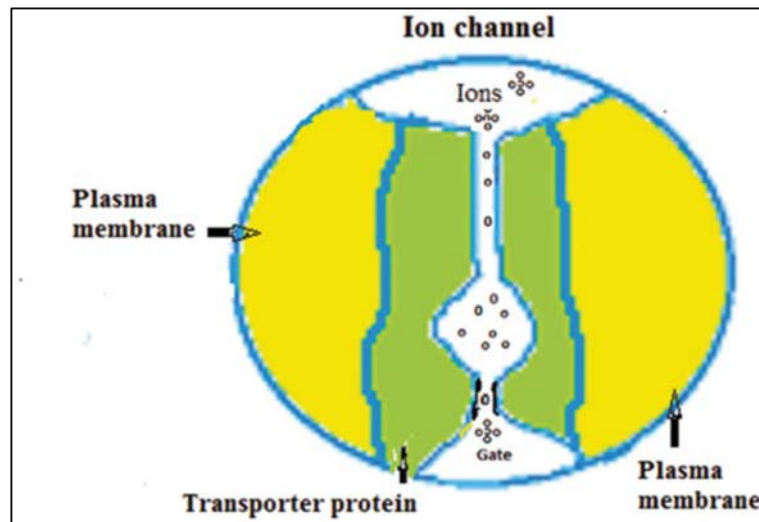


Figura 3. Rappresentazione di un canale ionico. Immagine tratta da Mitra (2015).

Gli ioni sono trasportati da proteine, che sono troppo grandi per muoversi attraverso la membrana; esse sono quindi proteine trans-membrana con una

posizione fissa all'interno di essa. Le proteine di trasporto sono suddivise in due classi:

- 1) canali ionici
- 2) trasportatori ionici (carrier)

1.9.1. Canali ionici

Le proteine dei canali ionici cellulari sono grosse molecole con numerose α -eliche transmembrana. I canali alternano la conformazione aperta e chiusa (gating) (**Fig. 4**).

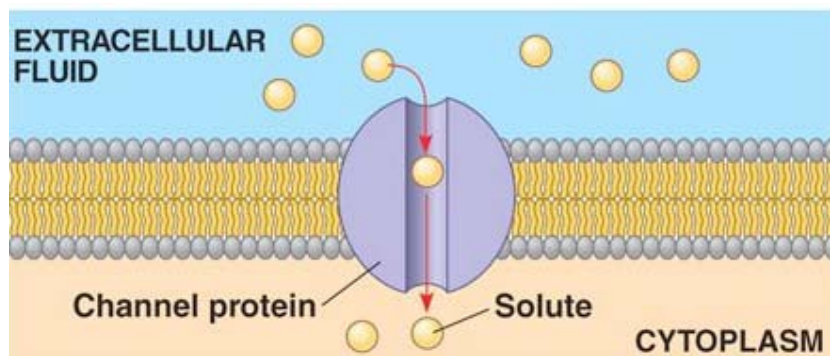


Figura 4. Rappresentazione di una proteina trans-membrana con funzione di canale ionico e meccanismo di chiusura/apertura del canale (tratto dal sito <https://physiologue.wordpress.com>).

Il controllo dell'apertura e della chiusura dei canali è una forma di regolazione allosterica. Il cambiamento conformazionale delle proteine del canale può essere causato da uno qualsiasi dei seguenti fattori estrinseci:

- 1) Cambiamenti nel potenziale di membrana
- 2) Piccole molecole regolatrici
- 3) Allungamenti della membrana (Dubyak 2004; Diwan 2007)

Questi fattori determinano se il canale è in stato *gated* (aperto per il trasporto ionico) o in stato chiuso (incapace di trasporto ionico).

I fattori estrinseci controllano l'accessibilità degli ioni al dominio dei pori e agiscono come un percorso per il movimento di ioni da un lato all'altro della

membrana. Infatti, non si sviluppa nessuna interazione energetica tra le proteine del canale e gli ioni trasportati. La velocità di trasporto degli ioni attraverso i canali è molto spesso più veloce rispetto alle proteine tipo carrier (Dubyak 2004).

1.9.2. Trasportatori ionici (Carrier)

Sono enzimi vettori il cui funzionamento prevede (Dubyak, 2004):

- 1) Un riconoscimento/legame selettivo dello ione che deve essere trasportato
- 2) Il cambiamento conformazione tale della proteina Carrier dovuto al legame con lo ione
- 3) Il movimento fisico dello ione attraverso la membrana causato da tale cambiamento conformazione

Il trasportatore ionico può catalizzare il movimento di ioni contro il loro gradiente elettrochimico grazie all'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP (H^+ -ATPasi). Ci sono tre tipi di trasportatori ionici (**Fig. 5**):

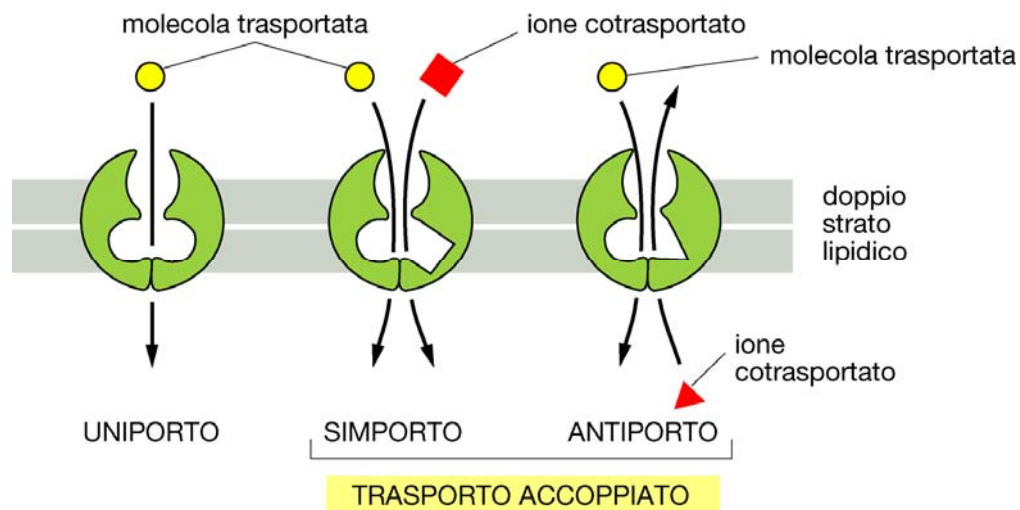


Figura 5. Meccanismi di trasporto uniporto, simporto ed antiporto (tratto da slideplayer.it/slide/10852624/).

Uniporto: è il trasporto secondario di una sola sostanza che si muove sfruttando la differenza di potenziale elettrochimico creato da trasportatori primari

Simporto: è il trasporto contemporaneo di due specie ioniche o di altri soluti che si muovono in direzioni diverse attraverso la membrana. Una delle due sostanze viene lasciata fluire secondo gradiente, da un compartimento ad alta concentrazione ad uno a bassa concentrazione. Questo genera l'energia entropica necessaria per guidare il trasporto dell'altro soluto contro gradiente, da bassa ad alta concentrazione.

Antiporto: usa, analogamente all'antiporto, il flusso di un soluto secondo gradiente per muovere un'altra molecola contro gradiente ma il movimento avviene in questo caso attraversando la membrana nella stessa direzione. Un esempio è il simportatore di glucosio, che cotrasporta secondo gradiente due ioni sodio per ogni molecola di glucosio importata nella cellula.

1.10. Il microelemento boro

Il boro è un nutriente attivo nel metabolismo dei carboidrati e nel trasporto degli zuccheri attraverso le membrane. Questo elemento prende parte alla formazione della parete cellulare, alla divisione cellulare e allo sviluppo di foglie e infiorescenze. La sua carenza provoca un disturbo nell'attività meristematica e può danneggiare il funzionamento di meccanismi di riserva; inoltre si manifesta con deformazioni su fiori e frutti.

1.10.1. Presenza di boro e reazioni nel suolo

Il boro è presente sulla crosta terrestre nella maggior parte delle rocce ignee ad una concentrazione inferiore ai 10 mg g⁻¹. Il boro in forma minerale nel suolo è presente principalmente nella Tormalina, un boro silicato relativamente insolubile (**Fig. 6**).

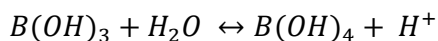
La concentrazione totale di boro nei suoli è perlopiù intorno ai 7-80 µg g⁻¹. Circa il 95% del boro presente nel suolo non è tuttavia disponibile per le piante. Circa 0,1 mg g⁻¹ di boro nella soluzione suolo è una concentrazione ritenuta adeguata per la maggior parte delle monocotiledoni (Havlin et al. 2007).



Figura 6. Tormalina, boro silicato presente nel suolo (tratta da en.wikipedia.org/wiki/Tourmaline).

La tessitura del suolo, il contenuto di umidità, il pH, il contenuto di sostanza organica e le interazioni con gli altri nutrienti sono alcuni dei fattori che influenzano la disponibilità di boro nel suolo. Terreni con una struttura grossolana e ben drenati hanno in genere un uno scarso contenuto in boro. Bassi tassi di umidità nel terreno riducono il rilascio di boro dalla sostanza organica e impediscono il flusso di diffusione e di massa alla rizosfera delle piante. La disponibilità di boro diminuisce con l'aumento del pH sopra valori di 6,3-6,5. Il boro, nella soluzione suolo, esiste principalmente come acido borico, $B(OH)_3$.

L'acido borico è un acido debole, con una pK_a di 9,24. Con un pH del suolo maggiore di 9, l'acido borico forma lo ione $B(OH)_4^-$ (Woods 1996):



La forma in cui le radici assorbono meglio l'acido borico è H_3BO_3 .

1.10.2. Il contenuto di boro nelle piante

Il boro è un micro-nutriente non metallico definito essenziale per le piante più di novant'anni fa. Questo elemento prende parte alla formazione della parete cellulare, alla divisione cellulare e allo sviluppo di foglie e infiorescenze. La sua carenza

provoca un disturbo nell'attività meristematica e può danneggiare il funzionamento di meccanismi di riserva; inoltre si manifesta con deformazioni su fiori e frutti.

Il range di concentrazione di boro nel suolo compreso tra carenza di boro e tossicità per le piante è assai ridotto. La tolleranza alla carenza di boro così come alla sua tossicità varia considerevolmente tra le diverse specie di piante e i loro diversi genotipi. È stato dimostrato che la carenza di boro riduce la produttività di 132 coltivazioni in 80 Stati (Takano et al. 2002). Il boro è stato a lungo considerato come essenziale per le piante ma non per i microrganismi e gli animali (Marshner 1995). Ad ogni modo composti contenenti boro sono stati ritrovati nei batteri (Dembitsky et al. 2002; Chen et al. 2002; Amin et al. 2007).

La concentrazione di boro nelle monocotiledoni varia tra 6 e 18 $\mu\text{g g}^{-1}$ e nelle dicotiledoni da 20 a 60 $\mu\text{g g}^{-1}$. La carenza di boro si verifica generalmente a concentrazioni inferiori a 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ nei tessuti di foglie mature della maggior parte delle colture.

1.10.3 Contenuto di boro nell'acqua di irrigazione e sensibilità delle colture

L'acqua di irrigazione è classificata in tre gruppi in base al suo contenuto in boro (USDA 1954; Keren and Bingham 1985) e nella **Tabella 1** viene riportata la sensibilità di alcune colture in funzione della concentrazione di boro nelle acque di irrigazione.

1.11. Sintomi visivi di tossicità da boro

I sintomi visibili della tossicità da boro consistono generalmente in foglie clorotiche con macchie necrotiche spesso marginali e nelle estremità delle foglie più vecchie (Nable et al. 1997) (**Fig. 7**). Queste macchie necrotiche presentano concentrazioni di boro relativamente più alte se confrontate con l'area sfogliare circostante (Oerth e Roth 1969).

Tabella 1. Contenuto di B nelle acque di irrigazione e scala di sensibilità di alcune colture di interesse agrario.

Contenuto di B nelle acque di irrigazione	Sensibilità al boro	Colture
< 0,3 mg L ⁻¹	Sensibile	Fagiolo, melo, avocado, arancio
1-2 mg L ⁻¹	Semi-tollerante	Avena, mais, patata, patata dolce, pomodoro, radicchio
2-4 mg L ⁻¹	Tollerante	Carota, erba medica, barbabietola, cipolla, palma, palma da datteri, rapa



Figura 7. Esempi di sintomi da eccesso di boro sulle foglie (tratte da scouthort.blogspot.it, www.winetitles.com.au, content.ces.ncsu.edu).

La tossicità da boro nei frutti si manifesta con comparsa di gommosi (**Fig. 8**), mentre nello stelo si evidenziano necrosi interne e della corteccia che portano al collasso della pianta (Brown e Hu 1996). La concentrazione di boro nei tessuti

radicali rimane generalmente bassa e le radici non sembrano essere influenzate dalla tossicità da boro (Oerth e Roth 1969; Nable et al. 1997).



Figura 8. Esempi di sintomi da eccesso di boro in frutti (tratte da www.omafr.gov.on.ca, www.ucanr.edu).

1.12. Tossicità da boro, effetti sul metabolismo delle piante

La tossicità da boro induce modificazioni nel metabolismo dell'azoto. Silva et al. (2015) analizzarono l'effetto di diverse concentrazioni di boro su piante di *Schizolobium parahyba*. Gli aminoacidi accumulati nella foglia erano associati all'attività dell'enzima proteasi, in concomitanza all'inibizione della biosintesi di proteine che si verifica a causa dell'elevata concentrazione di boro. Secondo Paula et al. (2015) l'incremento dell'attività delle proteasi promuove la scissione e la conseguente diminuzione di proteine, aumentando di conseguenza la quantità totale di aminoacidi che potrà poi essere usata per la sintesi di altri aminoacidi come ad esempio la prolina. Risultati simili sono stati riportati anche dagli studi di Cervilla et al. (2013) in piante di *Solanum lycopersicum*.

Silva et al. (2015) evidenziarono un incremento della concentrazione di prolina nelle piante sottoposte ad eccesso di boro ed ipotizzarono che questo aminoacido poteva essere coinvolto nel processo di disintossicazione delle ROS e nella protezione della membrana contro la perossidazione lipidica. La prolina ha, infatti, un'azione antagonista nei confronti delle ROS, protegge le proteine dalla

denaturazione e stabilizza la membrana cellulare tramite la sua interazione con i fosfolipidi. La prolina un aminoacido sintetizzato nel metabolismo dell'azoto con funzioni legate alla protezione osmotica e a all'omeostasi cellulare, che può contribuire a migliorare la tolleranza delle piante a situazioni di stress abiotici, come la tossicità da boro.

1.13. Funzioni biochimiche del boro nelle piante

Il boro è essenziale per la struttura e il funzionamento della parete cellulare. La parete cellulare primaria delle piante superiori è costituita da cellulosa, emicellulosa e polisaccaridi peptidici, a loro volta costituiti da polisaccaridi ricchi di acido galatturonico che forma una matrice idratata in cui si integra la rete di cellulosa ed emicellulosa.

I maggior componenti della matrice peptidica sono gli omogalatturonani (HG), i ramnogalatturonani di tipo I (RG-I) ed i ramnogalatturonani di tipo II (RG-II). Il boro forma legami incrociati nei polisaccaridi peptidici grazie all'adesione del borato diestere a due molecole di ramnogalatturonani II nella parete cellulare. Gli RG-II sono presenti nella parete cellulare primaria delle angiosperme, delle gimnosperme e delle pteridofite. Gli RG-II sono composti da almeno 12 diversi residui glicosidici collegati tra loro da più di 20 legami glicosidici. Il RG-II è costituito da due catene di omogalatturonano ed è legato, tramite un legame covalente del borato diestere per formare un dimerico (**Fig. 9**).

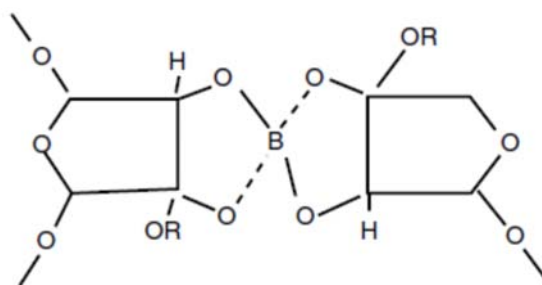


Figura 9. Rappresentazione della struttura molecolare del ramnogalatturonano II.

La formazione di questo dimero è necessaria per la struttura tridimensionale della rete di pectine nella parete cellulare. Questa rete conferisce la resistenza meccanica alla parete cellulare ed è necessaria per la normale crescita delle piante ed il loro sviluppo. La carenza di boro si manifesta in una riduzione dei legami incrociati del borato ed un cambiamento nelle proprietà della parete cellulare e le piante (O'Neill et al. 2004). Secondo Matsunaga et al. (2004), il legame incrociato del borato nel RG-II è correlato con la capacità delle piante vascolari di mantenere la crescita verticale. RG-II è probabilmente l'unico polisaccaride contenente boro facente parte della parete cellulare primaria.

1.14. Meccanismi di assorbimento del boro delle piante

Il boro è presente nella soluzione del suolo principalmente come acido borico (H_3BO_3) o come borato. L'acido borico ha una carica neutra ed è la principale forma chimica in cui il boro è assorbito dalle piante (Marshner 1995). Il doppio strato lipidico è permeabile all'acido borico. Prima del 1990 si pensava che l'assorbimento di boro nelle piante avvenisse attraverso il trasporto passivo, senza alcun sostegno di trasportatori proteici. Nell'apice radicale dove la Banda di Caspary non è pienamente sviluppata, i soluti possono entrare nello xilema attraverso il flusso apoplastico, un importante percorso per il trasporto del calcio ai germogli (White 2001). Le bande di Caspary sono strati lipidici idrofobici (suberina) presenti nella parete cellulare tra le cellule endodermiche, esse bloccano il flusso apoplastico di soluti nella stele.

L'assorbimento di nutrienti delle piante attraverso la maggior parte delle radici coinvolge il trasporto attraverso la membrana plasmatica e le bande di Caspary due volte, una volta per entrare nella cellula e successivamente per portarli fuori dalla cellula all'interno dello xilema. Due tipi di proteine trasportatrici sono

richieste per tale flusso sinplastico, una per l'influsso e l'altra per l'efflusso di soluti (Miwa e Fujiwara 2010).

1.15. Trasportatori del boro

Due tipi di trasportatori del boro sono stati identificati in *Arabidopsis thaliana*, che sono coinvolti nell'assorbimento del boro in condizioni di carenza di boro, NIP5;1 e BOR1.

1.15.1. Trasportatore NIP 5, 1

Il trasportatore NIP 5, 1 è una proteina del canale dell'acido borico localizzata nella membrana plasmatica, che facilita l'afflusso di boro nelle cellule della radice sotto condizioni di carenza da boro (Takano et al. 2006). NIP 5, 1 fa parte della superfamiglia delle MIP (*Major Intrinsic Protein*), che include le acquaporine. Il gene NIP 5, 1 aumenta la sua attività sotto condizioni di carenza da boro. Le NIP tra tutte le MIP delle piante sono state segnalate come trasportatori di numerose piccole molecole prive di carica quali il glicerolo, l'urea e l'acqua (Wallace e Roberts 2005; Takano et al. 2006). Gli studi hanno indicato che NIP 5, 1 viene espressa negli organi del germoglio quali i nodi del fusto e le foglie (Schmid et al. 2005).

1.15.2. NIP 6, 1

Il trasportatore NIP 6, 1 è simile all'NIP 5, 1. Esso facilita il rapido trasporto dell'acido borico attraverso le membrane ma è completamente impermeabile all'acqua. La carenza di boro porta a una trascrizione del NIP 6, 1 ed un suo accumulo nei germogli, ma non nelle radici. Il NIP 6, 1 è un canale dell'acido borico necessario, soprattutto nei giovani tessuti in sviluppo, per una corretta distribuzione del boro. È stato inoltre suggerito che il NIP 6, 1 sia coinvolto nel trasferimento dell'acido borico dallo xilema al floema nelle regioni nodali (Tanaka et al. 2008).

1.15.3. BOR 1

BOR 1 è il primo trasportatore di boro identificato nel sistema biologico. BOR 1 è omologo al trasportatore di bicarbonato negli animali. Il gene di BOR 1 in *Arabidopsis* è stato identificato tramite una mappatura genetica e studi complementari. Esso codifica una proteina della membrana plasmatica, coinvolta nell'efflusso del boro dalle cellule (Takano et al. 2002).

BOR 1 è coinvolto nel trasferimento del boro nello xilema contro il gradiente di concentrazione in condizioni di carenza di boro e protegge i germogli dalla sua carenza. L'accumulo di BOR 1 è elevato, soprattutto nella membrana plasmatica, in condizioni di carenza di boro; quando la concentrazione di boro è elevata l'espressione di BOR 1 è trascurabile. Quando BOR 1 è presente in eccesso, esso viene incorporato negli endosomi e trasportato nel vacuolo per la degradazione (Takano et al. 2005).

Questo meccanismo di espressione del BOR 1 regolato dalla concentrazione di boro previene un accumulo inutile di boro nei germogli e previene inoltre la tossicità da boro.

1.15.4. BOR 4

BOR 4 è un trasportatore di efflusso, che si esprime in condizioni di elevata concentrazione di boro. Esso è localizzato nella parte distale dell'epidermide nelle radici. Una consistente espressione di BOR 4 nelle piante le rende tolleranti ad elevate concentrazioni di boro (Miwa and Fujiwara 2009). In condizioni di carenza di boro l'espressione coordinata di NIP 5, 1 per l'acquisizione di boro e di BOR 1 per la sua traslocazione nello xilema sembra essere un meccanismo efficace per la traslocazione del boro dal suolo ai germogli delle piante. Il BOR 1 probabilmente genera un gradiente di concentrazione tra le cellule radicali e la rizosfera per

facilitare l'assorbimento di boro nelle cellule radicali da parte del canale dell'acido borico (NIP 5, 1) (Miwa e Fujiwara 2010).

Il BOR 1 non è esclusivamente coinvolto nel carico dello xilema ma anche nella distribuzione del boro all'interno dei germogli.

1.16. Miglioramento genetico per incrementare la tolleranza alle carenze e all'eccesso di boro

1.16.1. Carenza di boro

È stato riportato che la sovraespressione di BOR 1 migliora la crescita del germoglio in condizioni di carenza di boro ma non mostra alcun effetto sulla crescita delle radici (Miwa e Fujiwara 2010). La sovraespressione di NIP 5, 1 migliora l'allungamento della radice in condizioni di scarsa presenza di boro (Kato et al. 2009). La sovraespressione di entrambi (BOR 1 e NIP 5, 1) in *Arabidopsis thaliana* migliora l'accrescimento delle radici e dei germogli, e la pianta diventa significativamente tollerante alla carenza di boro (Miwa e Fujiwara 2010).

1.16.2. Tossicità del boro

La sovraespressione di BOR 4, un paralogo di BOR 1 in *Arabidopsis thaliana* svolge un ruolo importante nel rendere le piante tolleranti a concentrazioni di boro relativamente elevate (Miwa et al. 2007).

1.16.3. Tolleranza delle colture al boro

L'elevata variabilità genetica che caratterizza il mondo vegetale fa sì che ci siano specie di piante che sono più tolleranti rispetto ad altre ad alte concentrazioni di microelementi nel suolo. Questa differente sensibilità può essere considerata anche in diverse cultivar appartenenti alla stessa specie.

È stato riportato che le cultivar di riso Japonica sono più tolleranti ad alte concentrazioni di boro delle cultivar di riso indica (Ochiai et al. 200); tuttavia le concentrazioni di boro nelle loro radici e nei germogli non sono significativamente diverse.

Lavori precedenti (Landi et al., 2012; Landi et al., 2013; Pardossi et al., 2015) hanno dimostrato questa diversità per quanto riguarda la resistenza alla tossicità da boro in diverse cultivar di basilico. Landi et al. (2012 e 2013) hanno riportato che la cultivar di basilico a foglia viola (Red Rubin) dimostrava una minore sensibilità ad elevate concentrazioni di boro nel terreno rispetto alla cultivar a foglia verde (Tigullio). Quando le piante venivano sottoposte ad una concentrazione di boro di 20 mg L^{-1} , la cultivar viola mostrava una minore necrosi sfogliare, un minor danno ossidativo e una minor riduzione della fotosintesi.

È stato inoltre dimostrato che in entrambe le cultivar di basilico (Tigullio e Red Rubin) l'inibizione della crescita causata dall'eccesso di boro non era causata da una riduzione dell'assorbimento di altri nutrienti (Pardossi et al., 2015). Le concentrazioni di assorbimento del boro e le concentrazioni di boro misurate nella linfa presente nello xilema hanno suggerito la presenza di un meccanismo che limita l'assorbimento di questo elemento ad alte concentrazioni esterne. La maggior tolleranza al boro nella cultivar Red Rubin rispetto alla cultivar Tigullio era apparentemente legata alla sua capacità di tollerare concentrazioni di boro più elevate nei tessuti radicali e nelle foglie e non alla capacità di limitarne l'assorbimento.

I meccanismi per i quali la cultivar Red Rubin manifesta una maggior tolleranza al boro non sono note; tuttavia, la presenza di un'elevata concentrazione di antociani nell'epidermide fogliare è la differenza più ovvia tra le due cultivar, per tale motivo Landi et al. (2013) hanno suggerito che l'elevata concentrazione di

antociani nella foglia giochi un ruolo importante nella tolleranza al boro della cultivar a foglia viola.

Quando le piante sono sottoposte a stress ambientali quali l'elevata intensità luminosa, temperature estreme, siccità, elevata salinità, trattamenti erbicidi, o disordini minerali l'equilibrio tra la produzione di ROS e l'attività degli antiossidanti è alterata e spesso porta ad un conseguente danno ossidativo (Wise e Naylor, 1987; Mittler, 2002). Le piante con un elevato contenuto di antiossidanti sono caratterizzate dall'avere una elevata resistenza a questo danno ossidativo (Dhindsa e Matowe, 1981; Wise e Naylor, 1987; Foyer e Shigeoka, 2011).

Il glutathione e l'ascorbato sono antiossidanti ben noti per la loro capacità di *scavenger* dei radicali liberi, ma c'è un numero crescente di prove che conferma che altre molecole quali fenoli, antociani e flavonoidi possono aumentare le capacità antiossidanti in molte specie vegetali, specialmente erbacee (Zheng e Wang, 2001; Javanmardi et al., 2002; Shan et al., 2005; Surveswaran et al., 2007; Lee e Scagel, 2009).

Gli antociani potrebbero avere un ruolo nella maggior tolleranza all'eccesso di boro riducendo il carico ossidativo sul cloroplasto caratterizzato da una ridotta capacità di elaborare l'energia luminosa dovuta alla tossicità da boro. Gli antociani sono antiossidanti estremamente potenti, in grado di rimuovere la maggior parte delle specie reattive di ossigeno e potrebbero contribuire al pool di antiossidanti nel basilico a foglia viola (Landi et al., 2013).

Tuttavia gli antociani risiedono esclusivamente nell'epidermide e non sono quindi situati in una posizione ottimale per rimuovere le ROS prodotte nei cloroplasti. Un altro ruolo che gli antociani potrebbero avere nella maggior tolleranza al boro delle cultivar di basilico a foglia viola è il loro assorbimento di una parte dell'energia luminosa incidente; in questo modo gli antociani possono ridurre la generazione di ROS da parte dei cloroplasti influenzati da tossicità da

boro all'interno del mesofillo sfogliare (Neill e Gould 2003; Kytridis et al. 2008; Hughes et al. 2012; Hatier et al. 2013).

Infine gli antociani potrebbero chelare gli ioni boro soprannumerari e sequestrarli nel vacuolo della cellula. La capacità chelante degli antociani per gli ioni metallici è stata riportata per tungsteno, alluminio, rame, gallio, ferro e molibdeno. Tuttavia non ci sono ancora evidenze scientifiche che dimostrino la presenza di chelati B-antociani nella pianta (Landi et al. 2014).

Capitolo 2: Caratteri botanici, biologia ed utilizzo del basilico

Il basilico è una pianta erbacea, aromatica, appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae* (*Labiatae*) e le sue foglie tenere vengono utilizzate per fare salse (ad esempio il pesto alla genovese), oppure quelle adulte sono utilizzate per aromatizzare le vivande. È utilizzata anche come pianta ornamentale odorosa per terrazzi e giardini. Conosciuta fin dall'antichità, dai romani (citata da Plinio) che la usavano in cucina, ma anche come pianta medicinale da applicare sulle ferite. Il suo impiego in cucina e la coltivazione si sono sviluppati a partire dal 1500 in tutto il mondo, ma soprattutto nei paesi mediterranei. In Italia, le coltivazioni sono sviluppate su circa 200 ha di cui 120 in serra, soprattutto in Liguria, Lazio, Emilia-Romagna e Toscana. È presente sul mercato tutto l'anno, raccolto in diversi stadi di sviluppo, precoce (per fare il pesto) o a sviluppo più avanzato per aromatizzare pizze e salse di pomodoro. Il "Basilico Genovese" ha ottenuto la DOP nel 2005.

L'industria alimentare lo utilizza come prodotto aromatizzante per salse o per ottenere polveri da condimento. In alcuni paesi caraibici, e nelle zone centro meridionali della Russia, si coltiva per estrarre essenze usate in profumeria. La parte

edule (basilico a mazzetti) raggiunge il 100% e la composizione media (per 100 g di prodotto fresco) (**Tab. 2**).

Da un punto di vista alimentare il basilico presenta una composizione interessante in vitamine e sali minerali, ma normalmente si prendono in considerazione solo le caratteristiche aromatiche dovute al suo olio essenziale. Il contenuto in olio essenziale nelle foglie fresche varia da 40 a 80 mg/100 g a seconda delle varietà, ed anche la sua composizione molto variabile tanto che è possibile selezionare cultivar con aromi diversi.

Tabella 2. Composizione media per 100g di basilico fresco (da Tesi, 2010).

<i>acqua</i>	92.3 g	<i>Energia</i>	39 kcal	<i>Vit. A</i>	0.65 mg
<i>Proteine</i>	3.1 g	<i>Potassio</i>	300 mg	<i>Vit. C</i>	26 mg
<i>Lipidi</i>	0.8 g	<i>Fosforo</i>	37 mg	<i>Tiamina</i>	0.08 mg
<i>Carboidrati disponibili</i>	5.1 g	<i>Calcio</i>	250 mg	<i>Riboflavina</i>	0.31 mg
<i>Zuccheri solubili</i>	5.1 g	<i>Sodio</i>	9 mg	<i>niacina</i>	1.10 mg
<i>Fibra alimentare</i>	—	<i>ferro</i>	5,5 mg		

L'olio essenziale è costituito da oltre 20 componenti; nel basilico Genovese e selezioni derivate, prevalgono eugenolo, linalolo e cineolo, (aroma fragrante, dolce e fresco), nel basilico Greco a palla nano e Napoletano bolloso prevalgono estragolo, linalolo e cineolo (aroma fragrante, dolce, di menta fresca). Il basilico più apprezzato in Italia è quello senza aroma di menta. L'estrazione dell'olio essenziale si effettua da piante raccolte all'inizio della fioritura, ed essiccate; la resa in olio varia da 2 a 4 kg per tonnellata di sostanza secca.

Al genere *Ocimum* oltre ad *O. basilicum* L. appartengono anche altre specie: *O. menthaefolium* Hochst (diffuso in Eritrea e sull'altopiano abissinico) con aroma di menta, non coltivato in Italia; *O. gratissimum* L. o basilico arborescente con fiori

color lilla, originario dell'india con aroma accentuato di timo, non coltivato in Italia ed usato in profumeria; *O. canum* Sims diffuso nei paesi tropicali e caratterizzato da un accentuato aroma di canfora, non coltivato in Italia.

O. basilicum è una specie erbacea a ciclo annuale, che presenta una radice fittotonante, con molte ramificazioni superficiali di colore nerastro. Il fusto è quadrangolare con ramificazioni contrapposte all'ascella delle foglie; l'altezza varia da 20 a 30 cm nelle varietà nane sino a 60-80 cm nelle altre. Le foglie sono ovali lanceolate, lunghe da 1 cm (cv Nano greco) a 12-15 cm (cv Toscano a foglia di lattuga); il lembo può essere liscio o bollosa con margine ondulato o dentato, piano o convesso (a cucchiaino nella tipologia genovese), sostenuto da un picciolo di 1-2 cm; il colore è verde o violetto. I fiori sono riuniti in spighe con 10-15 verticilli di 6 unità, con fioritura che inizia dal basso; sono ermafroditi e zigomorfi di colore bianco o lilla (nelle varietà violette); l'impollinazione è entomofila ad opera di insetti (api in particolare) con un tasso di fecondazione incrociata dal 5 al 25% a seconda delle cultivar.

Le varietà di *O. basilicum* presenti in Italia sono numerose, si differenziano per taglia, forma, dimensioni delle foglie, tanto che in alcuni testi si incontra la suddivisione in 2-3 varietà botaniche (*O. basilicum*, var. maximum, minimum e bullatum). Di seguito sono riportate le principali varietà commerciali:

- A foglie piccole (lunghezza 1-2 cm): Greco a palla (aroma di menta), Fine verde, Limonino (aroma di limone).
- A foglie medie (lunghezza 6-8 cm): Superbo (genovese classico, italiano classico (genovese), Gecom (genovese compatto per vasetti), Red Rubin (foglie rosso-violaceo).
- A foglie grandi (lunghezza 8-12 cm): toscano ha foglie di lattuga (senza aroma di menta) napoletano a foglia di lattuga (con aroma di menta).

Capitolo 3: Obiettivi del lavoro

L'eccesso di boro è una tematica che ha una sua importanza in certi contesti agricoli nei quali per motivi diversi si verificano condizioni di eccesso di questo microelemento. Le perdite economiche dovute a questa fisiopatia sono importanti e per tale motivo la ricerca si sta indirizzando verso la comprensione dei meccanismi coinvolti nella resistenza evidenziata da lacune specie e/o cultivar nei confronti dell'eccesso di boro.

Studi precedenti avevano evidenziato come una cultivar a foglia rossa di basilico (Red Rubin) mostrasse una maggiore tolleranza all'eccesso di boro rispetto alla cultivar verde Tigullio.

Il presente progetto aveva quindi lo scopo di valutare se la maggior resistenza alla tossicità da boro della cultivar Red Rubin rispetto alla cultivar Tigullio di basilico fosse dovuta alla presenza di antociani nelle foglie della prima cultivar. Per verificare il ruolo degli antociani nella prova è stato utilizzato anche un mutante della cultivar Red Rubin priva di antociani.

A questo fine le cultivar Tigullio, a foglia verde, Red Rubin a foglia rossa e mutante del Red Rubin (a foglia verde e che chiameremo nel testo Green Rubin) sono stati coltivate in condizioni di eccesso di boro (25 mg L^{-1} di boro) e sono stati

quindi valutati di versi parametri fisiologici e biochimici connessi con la fotosintesi ed i meccanismi antiossidanti.

A questo fine al termine del trattamento con l'eccesso di boro le piante sono state valutate per i parametri biometrici. L'attività fotosintetica è stata valutata mediante l'uso degli scambi gassosi delle foglie e la misura della fluorescenza della clorofilla delle foglie. Sono stati quindi valutati i pigmenti e l'attività di tre dei principali enzimi antiossidanti: ascorbico perossidasi, catalasi e superossido dismutasi.

Capitolo 4: Materiali e metodi

4.1. Materiale vegetale

Sono state utilizzati tre genotipi di *Ocimum basilicum* L: la cultivar Tigullio, caratterizzata da foglie verdi, la cultivar Red Rubin, con caratteristiche foglie rosse e il suo mutante caratterizzato dalla perdita di antociani. I semi dei genotipi Tigullio e Red Rubin sono stati acquistati dall'azienda "Franchi Sementi Spa" (Milano). Il mutante a foglia verde, definito Green Rubin, invece è stato selezionato presso l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR di Firenze (Sesto F.no, Firenze) dal Dott. Federico Sebastiani e dal Dott. Massimiliano Tattini come descritto di seguito.

Alcuni mutanti spontanei ritrovati in semine di Red Rubin, sono stati sottoposti a cicli di autoimpollinazione controllata fino al raggiungimento della terza generazione (S3). In questo modo è stato ottenuto un mutante condizionale che nelle condizioni sperimentali adottate è risultato incapace di sintetizzare antociani. Pur non conoscendo il sito della mutazione avvenuta in piante di Green Rubin, possiamo affermare con ragionevole certezza che il genotipo non sia difettivo per la produzione di antociani e non si tratti, quindi, di un mutante funzionale in quanto

in determinate condizioni, differenti da quelle adottate in questo esperimento (per esempio a basse temperature), le foglie sono risultate in grado di sintetizzare ed accumulare una piccola quantità di tali pigmenti (Landi et al. Dati non pubblicati).

4.2. Condizioni di coltivazione

L'esperimento è stato condotto in una serra in vetro presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa. La semina del basilico è avvenuta il 5 maggio 2016 in plateau alveolati nei quali le piantine sono rimaste sino allo sviluppo della seconda foglia (circa 2 settimane). A questo punto (nell'intervallo tra il 20 maggio ed il 1° giugno 2016) il basilico (40 piante per ogni genotipo) è stato posto in *floating system* (**Fig. 10**) con una soluzione nutritiva ottimale per promuoverne un rapido accrescimento.



Figura 10. Immagine della coltivazione dei diversi genotipi di *Ocimum basilicum* in condizioni di floating system.

Dal 1° giugno fino al 14 giugno è stata differenziata la concentrazione di boro nella soluzione nutritiva; le piante sottoposte a stress da eccesso di boro (20 piante per ogni genotipo) hanno ricevuto una soluzione nutritiva contenente 25 mg L⁻¹ di boro, mentre la soluzione nutritiva delle piante controllo (20 piante per ogni

genotipo) conteneva $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ di boro (**Fig. 11**).

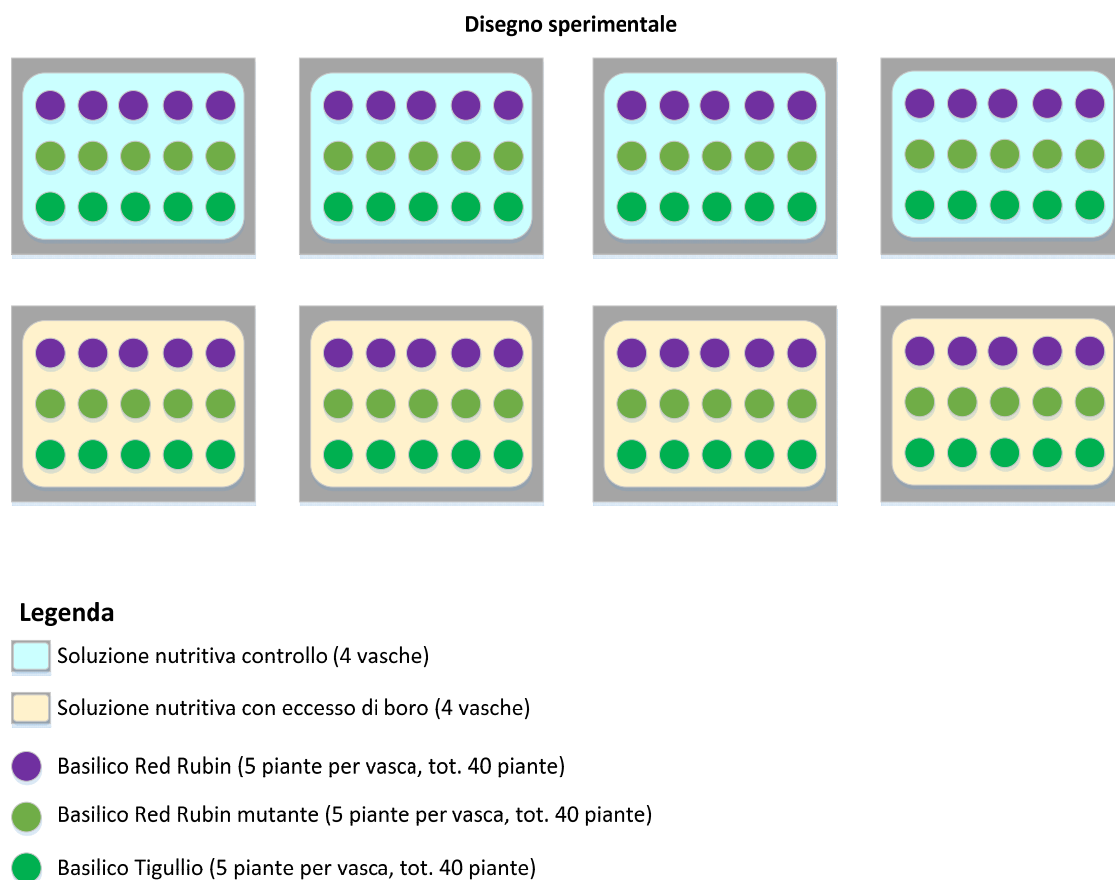


Figura 11. Rappresentazione dello schema sperimentale seguito nella sperimentazione.

La ricetta delle due soluzioni nutritive viene riportata in **Tabella 3**. Per compensare l'assorbimento della soluzione nutritiva da parte delle piante e mantenere ottimali le concentrazioni degli elementi nutritivi, è stata aggiunta periodicamente la soluzione nutritiva fino al raggiungimento dei valori target di conducibilità elettrica e pH nella soluzione presente in vasca.

Al termine della sperimentazione sono stati valutati i diversi parametri fisiologici e biochimici sulle piante sottoposte ai diversi trattamenti e di seguito descritti.

Tabella 2. Soluzioni nutritive utilizzate per la prova sperimentale.

Elementi nutritivi	Soluzione controllo	Soluzione con eccesso di boro
Macronutrienti	(mmol/l)	(mmol/l)
NO ₃ ⁻	14	14
NH ₄ ⁺	0,5	0,5
K ⁺	10	10
Ca ²⁺	4	4
Mg ²⁺	1	1
PO ₄ ²⁻	1,2	1,2
SO ₄ ²⁻	2	2
Na ⁺	10,1	10,1
Micronutrienti	(μmol/l)	(μmol/l)
Mn ²⁺	10	10
Zn ²⁺	5	5
HBO ₃	22,5	2250
Cu ²⁺	1	1
Mo ³⁺	1	1
Fe ²⁺	56	56
EC soluzione: 3 dS/m		
pH soluzione: 5,5		

4.3. Determinazione del peso fresco e secco delle piante

La biomassa viene rappresentata dal peso secco per unità di superficie prodotta (g pianta⁻¹). Solitamente il peso secco rappresenta il 10% di quello fresco. Per la determinazione del peso fresco (fw) e del peso secco (dw) della biomassa, cinque repliche per ogni genotipo sono state separate in: foglie, fusto, radici e pesate (fw). Successivamente i campioni sono stati seccati in stufa a 80°C per 72h e ripesati (dw).

4.4. Concentrazione di boro nelle foglie con metodo dell'azometrina-H

Questo metodo, sviluppato da Shanina et al. (1967), si è dimostrato particolarmente affidabile per l'analisi del B nelle acque e negli estratti da materiali vegetali e suolo.

Allo stesso tempo, tale metodo è facile, rapido, sensibile e soggetto a minime interferenze. Il principio di questa procedura si basa sulla presenza in soluzione di una concentrazione di B di 0,5-1 $\mu\text{g L}^{-1}$. A queste concentrazioni e a pH 5,1, l'idrogeno-azometina reagisce rapidamente con B(OH)_3 per formare un complesso di colore giallastro che si forma senza subire interferenze da parte di altri sali in soluzione. La quantità di complesso che si forma è stechiometrica con la concentrazione di B.

Per la prova sono stati aggiunti ad un matraccio da 25 mL di acqua distillata, 5 mL di campione (estratto da soluzione di cloruro di calcio a caldo), 3 mL di soluzione tampone ed infine 5 mL di soluzione di idrogeno-azometrina.

Portata la soluzione a volume, con l'aggiunta di acqua distillata, e omogenizzata, è stata fatta reagire per 2 ore agitandola periodicamente. Successivamente è stato letto allo spettrofotometro il valore dell'assorbanza a 420 nm delle soluzioni di riferimento e costruita la retta di taratura espressa in mg L^{-1} . Infine, per ogni soluzione è stata letta l'assorbanza e si è ricavato il valore della concentrazione di B.

4.5. Determinazione del contenuto di clorofille e carotenoidi

Il contenuto di clorofille e carotenoidi è stato determinato secondo il metodo descritto da Porra et al. (1989). Sono stati prelevati campioni di foglie di 0,3 g ed omogenizzati a secco con l'aggiunta di sabbia; successivamente vi sono state aggiunte aliquote di 500 μL di acetone 80% (circa 3 volte per un volume totale di 2.5 mL). Successivamente l'estratto è stato posto in una Eppendorf e centrifugato con centrifuga da tavolo (7000 rpm per 3'). Recuperato il surnatante è stato posto in un cilindro graduato da 10 mL, mentre il pellet è stato diluito con acetone e centrifugato fino a renderlo completamente privo di pigmenti; al termine di tutti i

lavaggi è stato annotato il volume finale di ogni campione che è presente nel cilindro graduato da 10 mL.

La lettura allo spettrofotometro è stata eseguita in cuvette di quarzo alle seguenti lunghezze d'onda:

- 663 nm: assorbimento preferenziale clorofilla a
- 648 nm: assorbimento preferenziale clorofilla b
- 470 nm: assorbimento preferenziale carotenoidi

4.6. Determinazione del contenuto di antociani

Gli antociani, oltre alle clorofille e ai carotenoidi, rappresentano un'altra importante classe di pigmenti presenti all'interno del regno vegetale. La loro struttura e conseguentemente il loro grado di colorazione sono strettamente connesse alle condizioni di pH all'interno della cellula, e soprattutto del vacuolo, all'interno del quale queste molecole sono preferenzialmente accumulate.

L'estrazione e la determinazione spettrofotometrica degli antociani vengono realizzate, quindi, in ambiente fortemente acido allo scopo di massimizzare l'assorbanza nel visibile (500-540 nm).

Per l'analisi del contenuto totale di antociani sono stati omogenizzati a freddo 100 mg di tessuto fogliare fresco con una aliquota di sabbia e successivamente sono stati addizionati 1 mL metanolo acidificato 1 % con HCl puro (MeOH: HCl; v:v). Al termine dell'estrazione il surnatante è stato raccolto in Eppendorf e centrifugato a 10000 rpm per 10' utilizzando una centrifuga da tavolo.

In seguito 100 µL del surnatante sono stati posti in cuvette in polistirene UV-vis ed addizionati con 900 µL della stessa soluzione precedentemente preparata di metanolo acidificato 0.1 % con HCl puro. L'assorbimento massimo è stato valutato a 530 nm. Per il calcolo della concentrazione è stato utilizzato il coefficiente

di estinzione molare della cianidina-3-glucoside valutato nello stesso solvente ($34300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

4.7. Determinazione dell'attività dell'enzima ascorbato perossidasi

La determinazione dell'attività dell'enzima ascorbato perossidasi è avvenuta secondo il metodo descritto da Lyons et al. (1999). Sono stati prelevati 0.2 g di materiale vegetale, posti in un mortaio ed omogenati con 0.1% polivinil polipirrolidone (PVPP; p/p) e 1 mL di miscela di estrazione costituita da K-P buffer 66 mM pH 7, Acido etilendiaminotetracetico (EDTA; 0,1 mM). L'omogenato è stato trasferito in Eppendorf e centrifugato a 10000 rpm per 10' a 4 °C. Il surnatante è stato recuperato ed utilizzato per saggio spettrofotometrico.

La miscela di reazione era composta da:

- K-P buffer 66 mM pH 7 + EDTA 0,1 mM (88 μL)
- Acido ascorbico 300 μM (SM 7.5 mM: 0.132g/100 mL) (40 μL)
- H_2O_2 1 mM (SM 20 mM: 200 μL /100 mL) (50 μL)
- Estratto 50 μL (50 μL)

La lettura spettrofotometrica è stata condotta per 1' e l'attività dell'enzima è stata calcolata mediante la legge di Lambert-Beer tramite il coefficiente di estinzione molare noto dell'acido ascorbico ($\epsilon_{\text{AsA}} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.8. Determinazione dell'attività dell'enzima superossido dismutasi

Un campione di materiale vegetale (0,2 g) è stato posto in un mortaio ed omogenato con 1mL di miscela di estrazione costituita da buffer Na-fosfato 66 mM (pH 7) e EDTA 1mM. L'omogenato è stato traferito inseguito in Eppendorf e centrifugato a

10000 rpm per 5'. Il surnatante così ottenuto è stato utilizzato per la determinazione dell'attività dell'enzima.

Per la determinazione dell'attività dell'enzima SOD è stata impiegata la seguente miscela di reazione:

- Riboflavina 2 μ M (10 μ L)
- L-metionina 13 Mm (100 μ L)
- Nitro blue tetrazolio (NBT) 75 μ M (10 μ L)
- Tampone Na-fosfato 66 Mm (Ph 7.8)

Per ogni campione sono state preparate 4 diluizioni, cioè 4 cuvette costituite dalla stessa miscela di reazione ma da un quantitativo diverso di estratto e sono state fatte due repliche ogni diluizione. Le quantità delle diluizioni erano rispettivamente di 0, 2,5, 5, e 10 μ L. In ogni cuvetta è stato poi aggiunto un volume di tampone Na-fosfato 66 mM in modo tale da raggiungere in ciascuna cuvetta lo stesso volume. L'incubazione di una replica delle quattro diluizioni è stata fatta al buio a temperatura ambiente, mentre l'altra replica è stata incurvata a temperatura ambiente ma in condizioni di illuminazione. Al termine dell'incubazione sono state fatte le letture allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 560 nm. Il valore dell'attività enzimatica è stato poi ricavato ponendo a sistema il valore dell'estratto in cui si presumeva di avere il 50% dell'inibizione massima della SOD ed è stato poi ricavato nel modo seguente:

$$[C_0 \text{ (luce)} - C_0 \text{ (buio)}] / 2$$

dove C_0 rappresenta l'assorbanza della cuvetta con 0 μ L di estratto. Questo valore è stato posto sistema con l'equazione costituita dalle quantità di estratto e le rispettive assorbanza. Tale equazione è stata risolta in funzione della Y rappresentata dal valore [A]. Il valore così trovato è stato rapportato ai grammi iniziali di materiale vegetale utilizzato per esprimere l'attività della SOD come U

g-1 peso fresco. (1U viene definita come i μL di estratto che fanno diminuire del 50% il valore di assorbanza dei campioni).

4.9. Fluorescenza della clorofilla *a*

Prima dell'analisi della fluorescenza le foglie sono state adattate al buio per circa 40 min e le misure di fluorescenza venivano determinate mediante l'IMAGING-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germania). Attraverso questa metodologia sono state determinati i seguenti parametri:

Φ_{PSII} = resa quantica dell'efficienza fotochimica del PSII in condizioni di luce

$F_v/F_m = (F_m/F_0)/F_m$ resa quantica massima dell'efficienza fotochimica del PSII determinata in foglie adattate al buio

ETR (electron transport rate) = $(\Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84)$, dove PPFD indica la densità di flusso fotonico, 0,5 la distribuzione tra i due fotosistemi PSII e PSI e 0,84 è il coefficiente di assorbività della foglia). Questo parametro rappresenta una stima del flusso di elettroni trasportati sulle membrane tilacoidali mediante il trasporto elettronico lineare.

La fluorescenza della clorofilla *a* è stata determinata su 3 foglie per trattamento e per genotipo.

4.10. Scambi gassosi delle foglie

Le misure di scambi gassosi sono state effettuate mediante un sistema portatile (Li-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA) costituito da un analizzatore differenziale a raggi infrarossi (IRGA: InfraRed Gas Analyzer), collegato ad una camera fogliare tipo Parkinson. Al termine della prova sono stati misurati gli scambi gassosi delle piante sottoposte ai diversi trattamenti per mezzo dell'analizzatore LI-6400. Le misure, effettuate tra le ore 10 e le 11, sono state fatte su 3 piante per trattamento illuminando le foglie con un'intensità di PAR di circa $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

¹ imponendo una concentrazione ambiente di CO₂ pari a 380 ppm. Sono stati quindi determinati i seguenti parametri:

A: assimilazione netta di CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

gs: conduttanza stomatica al vapor acqueo ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

4.11. Valutazione dei sintomi di danno

La presenza di sintomi fogliari (clorosi e necrosi) indotti dalla tossicità da boro è stata valutata utilizzando il software open-source IMAGEJ (National Institute of Health, USA) ed espressa come percentuale di area necrotica sull'area totale della foglia.

4.12. Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati soggetti ad un'analisi della varianza a due vie (ANOVA). Le fonti di variabilità erano rappresentate dal genotipo e dalla concentrazione di boro nella soluzione nutritiva (0,25 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹); sono stati quindi stimati gli effetti dei singoli fattori e della loro interazione (genotipo x [B]) sui parametri analizzati. Quando il valore del rapporto dell'interazione era significativo, le medie sono state comparate utilizzando il test della differenza minima significativa di Fisher (LSD) con P=0,05. I dati percentuali relativi al danno fogliare sono stati prima trasformati e quindi sottoposti ad ANOVA ad una via con il genotipo come fattore di variabilità.

Capitolo 5:RISULTATI

Nella **Tabella 4** si riportano tutti i dati relativi all'analisi statistica di tutti i parametri considerati nell'esperimento i quali erano sottoposti ad un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie con il genotipo ed il trattamento con il boro come fonti di variabilità.

Tabella 4. Analisi statistica dei parametri analizzati nei tre genotipi di *O. basilicum* (Tigullio, Red Rubin e Green Rubin) sottoposti ad eccesso di boro (25 mg L⁻¹). Nella tabella viene riportata la significatività del rapporto F per i fattori di variabilità e la loro interazione.

Parametro	Genotipo	Trattamento B	Genotipo x Trattamento B
Sintomi visibili fg.	**	-	-
Peso fresco foglie	***	ns	ns
Peso secco foglie	***	ns	ns
Peso fresco fusto	***	ns	ns
Peso secco fusto	***	ns	ns
Peso fresco radici	***	***	*
Peso secco radici	***	***	*
[B] foglie	***	***	**
F _v /F _m	**	***	**
Φ _{PSII}	*	**	ns
ETR	**	**	ns
Fotosintesi	****	****	****
Cond. stomatica	****	****	****
Clorofilla <i>a</i>	ns	*	ns
Clorofilla <i>b</i>	ns	ns	*
Clorofille totali	ns	*	ns

Carotenoidi	*	ns	ns
Ascorbato perossidasi	**	ns	*
Superossido dismutasi	**	**	ns

****: $P < 0,00001$; ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$; ns: $P > 0,05$.

5.1 Sintomi visibili sulla pianta

Tutte le cultivar manifestavano sintomi visibili legati alla tossicità del boro, in particolare vi è una riduzione della resistenza meccanica dei fusti delle piante trattate con eccesso di B, le quali tendevano, infatti, a piegarsi lateralmente; altri sintomi visibili erano l'imbrunimento ed una crescita stentata delle radici, foglie clorotiche e/o necrotiche con ridotto turgore cellulare e ripiegate a doccia, ed una riduzione del contenuto di antociani nella cv Red Rubin (**Fig. 12**).



Figura 12. Immagine dei sintomi visibili di danno nei tre genotipi utilizzati nell'esperimento (da destra Tigullio, Red Rubin e Green Rubin, rispettivamente). Per ogni genotipo a sinistra le piante di controllo ($0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ B}$) e a destra quelle in eccesso di boro ($25 \text{ mg L}^{-1} \text{ B}$).

Nella **Figura 13** sono riportate le immagini delle foglie dei tre genotipi. Appare evidente come le foglie trattate con eccesso di B (immagine a destra per ciascun genotipo) mostravano evidente clorosi e necrosi localizzata principalmente ai margini fogliari.

Mediante l'analisi dell'immagine determinata mediante il software IMAGEJ tuttavia è risultato che la percentuale di danno sulle foglie dei tre genotipi non era

la stessa (**Fig. 14**), come già riportato da Landi et al. (2013), e un'incidenza maggiore veniva rilevata nelle foglie della cultivar Tigullio, pari al 49,43% (**Fig. 15**). Nel mutante del Green Rubin la clorosi era presente sul 41,80% della lamina fogliare ed ancora più bassa era la percentuale di area necrotica nella cv. Red Rubin (19,40%).

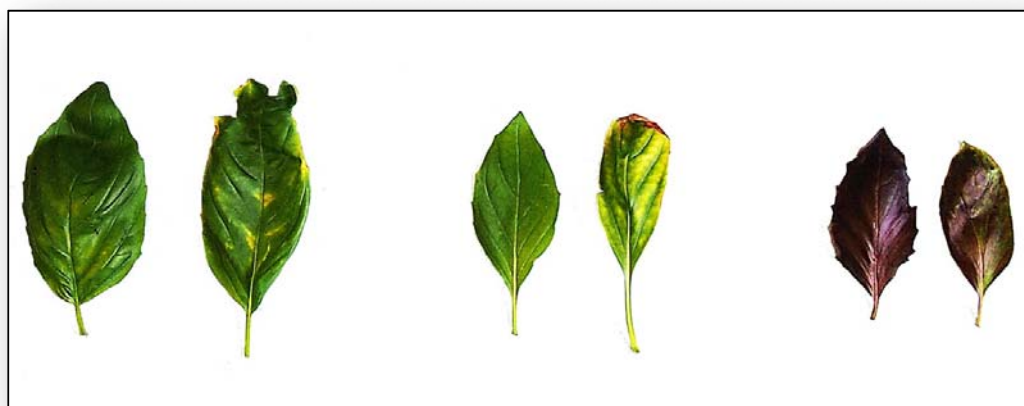


Figura 13. Immagine dei sintomi visibili di danno nei tre genotipi utilizzati nell'esperimento (da destra Tigullio, Red Rubin e Green Rubin, rispettivamente). Per ogni genotipo a sinistra la foglia delle piante di controllo ($0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ B}$) e a destra quella in eccesso di boro ($25 \text{ mg L}^{-1} \text{ B}$).

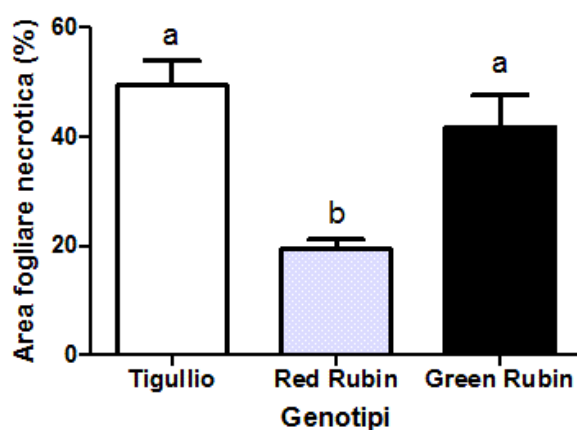


Figura 14. Percentuale di area necrotica a seguito del trattamento con eccesso di boro delle piante di Tigullio (barra bianca), Red Rubin (barra grigia), Green Rubin (barra nera). Ogni barra rappresenta la media di 3 repliche (\pm deviazione standard). Le lettere rappresentano medie statisticamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a una via con genotipo come fonte di variabilità.

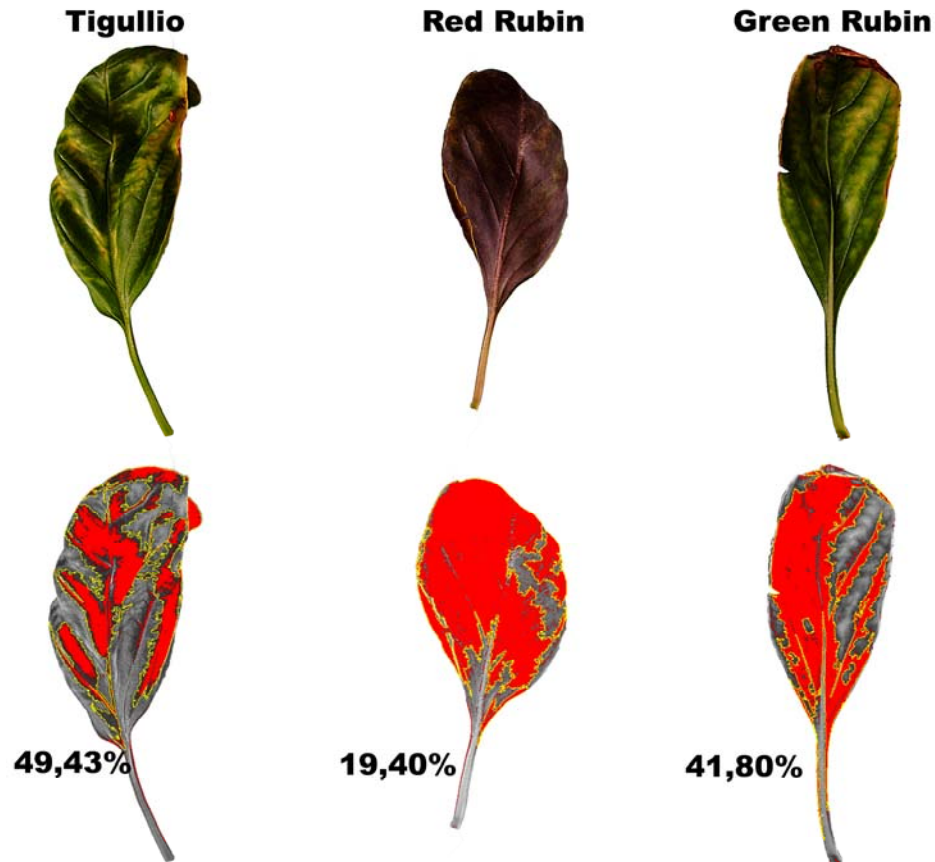


Figura 15. Immagine del danno fogliare nei tre genotipi utilizzati nell'esperimento e sottoposti a 25 mg L⁻¹ B. In alto la foto della foglia e in basso l'immagine rilevata con evidenziata la percentuale di area necrotica.

5.2 Effetti sulla biomassa delle piante

Dai risultati ottenuti (vedi **Tab. 4**) è evidente che i per i dati del peso fresco e secco delle foglie non vi era un'interazione significativa tra genotipo e boro. Tuttavia (vedi **Fig. 16; Tab. 3**) vi erano significative differenze di peso tra i genotipi, in particolare il genotipo Green Rubin ha mostrato un maggior peso fresco e secco delle foglie, come si vede anche nella **Figura 17** traducibile quindi in una maggior superficie fogliare.

Stessi risultati si hanno anche nel peso fresco e secco del fusto, con il genotipo Green Rubin che mostrava un peso secco e fresco del fusto maggiore degli altri genotipi (**Fig. 16 e Tab. 3**). Per le radici si evidenziava invece un'interazione

significativa tra genotipo e concentrazione di B (**Tab. 3**). Costitutivamente la cv. Tigullio presentava un peso secco e fresco maggiore del fusto rispetto agli altri due genotipi seguita dalla Green Rubin (**Fig. 16**).

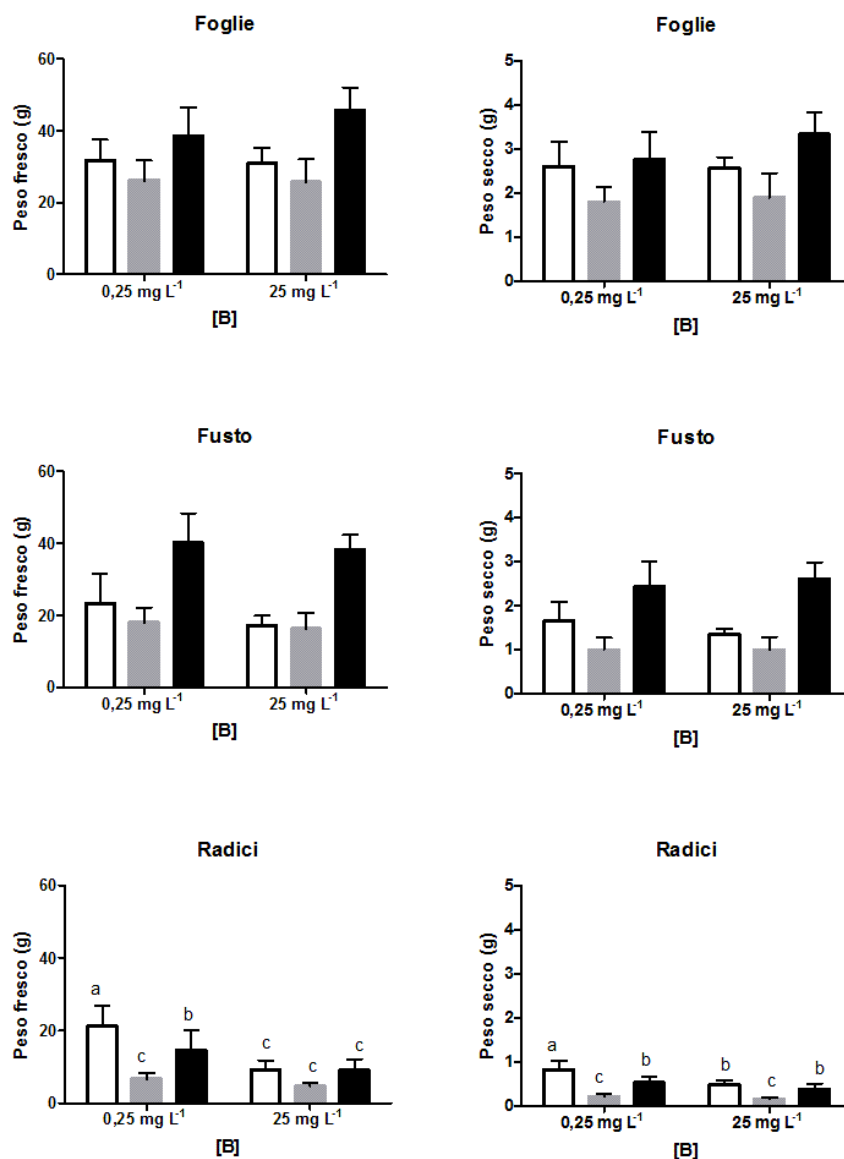


Figura 16. Peso fresco e secco dell'apparato fogliare, radicale e del fusto delle piante di Tigullio (barra bianca), Red Rubin (barra grigia), Green Rubin (barra nera) sottoposte a due concentrazioni di boro. Ogni barra rappresenta la media di 5 repliche (\pm deviazione standard). Le lettere rappresentano medie statisticamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a due vie con genotipo e trattamento come fonti di variabilità. L'assenza di lettere indica che l'interazione tra i due fattori non è significativa.



Figura 17. Immagine dell'accrescimento iniziale, in condizioni nutritive ottimali, dei diversi genotipi di *O. basilicum*; è evidente il maggior sviluppo del genotipo Green Rubin rispetto agli altri genotipi.

Si evidenziava quindi un minor sviluppo dell'apparato radicale del genotipo Red Rubin che si manteneva inalterato anche a seguito del trattamento; a seguito del trattamento con B si evidenziava invece una netta riduzione del peso fresco e secco della cv. Tigullio ed una riduzione del peso fresco della Green Rubin.

5.3 Concentrazione fogliare di boro

Nelle **Tabella 5** sono mostrati gli effetti del trattamento sulla concentrazione fogliare di boro nei diversi genotipi. E' evidente che non ci sono differenze costitutive nella concentrazione di boro tra i genotipi; tuttavia, quando sottoposti ad un eccesso di boro nella soluzione nutritiva, in accordo con Pardossi et al. (2015), in tutti i genotipi si riscontrava un aumento della concentrazione fogliare di boro. L'aumento era significativamente maggiore nei genotipi Green Rubin e Red Rubin rispetto al genotipo Tigullio.

Tabella 5. Concentrazione di B nelle foglie nei genotipi di *Ocimum basilicum* sottoposti a due concentrazioni di boro nella soluzione nutritiva. Ogni valore indica la media di 5 repliche (\pm deviazione standard). Medie seguite da lettere uguali non sono significativamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a due vie con il genotipo e il trattamento con B come fonti di variabilità.

<i>[B] Foglie (mg kg⁻¹)</i>			
<i>Trattamento</i>	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
<i>0,25 mg L⁻¹</i>	54 ($\pm 9,4$) c	109 ($\pm 28,7$) c	60 ($\pm 5,6$) c
<i>25 mg L⁻¹</i>	733 ($\pm 168,8$) b	974 ($\pm 65,2$) a	1088 ($\pm 125,3$) a

5.4 Fotosintesi

In **Tabella 6** sono riportati i risultati della fotosintesi netta e della conduttanza stomatica nelle foglie dei genotipi di *O. basilicum* sottoposti a due concentrazioni di boro nella soluzione nutritiva.

Tabella 6. Fotosintesi netta e conduttanza stomatica in foglie dei genotipi di *Ocimum basilicum* sottoposti a due concentrazioni di boro nella soluzione nutritiva. Ogni valore indica la media di 3 repliche (\pm deviazione standard). Medie seguite da lettere uguali non sono significativamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a due vie con il genotipo e il trattamento con B come fonti di variabilità. L'assenza di lettere indica che l'interazione tra i due fattori di variabilità non è risultata statisticamente significativa.

<i>Fotosintesi ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)</i>			
<i>Trattamento</i>	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
<i>0,25 mg L⁻¹</i>	15,2 ($\pm 0,74$) a	11,0 ($\pm 0,32$) b	14,9 ($\pm 0,40$) a.
<i>25 mg L⁻¹</i>	11,0 ($\pm 0,42$) b	10,1 ($\pm 0,25$) bc	9,8 ($\pm 0,94$) c

<i>Conduttanza Stomatica ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)</i>			
<i>Trattamento</i>	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
<i>0,25 mg L⁻¹</i>	185 ($\pm 12,3$) b	360 ($\pm 10,0$) a	198 ($\pm 14,1$) b
<i>25 mg L⁻¹</i>	190 ($\pm 26,4$) b	197 ($\pm 15,3$) b	136 ($\pm 19,3$) c

E' evidente che nel controllo la fotosintesi netta del Red Rubin è significativamente minore rispetto agli altri due genotipi emntre il suo mutante, privo di antociani, mostrava un'attività simile a quella rilevata nella cv. Tigullio. In presenza di un eccesso di boro però si evidenziava una notevole riduzione della fotosintesi netta del Tigullio e del Green Rubin, mentre l'attività del Red Rubin restava invariata. La conduttanza stomatica al vapore acqueo risultava molto

elevata nel controllo del Red Rubin. A seguito del trattamento con eccesso di boro nella soluzione nutritiva la riduzione più significativa si evidenziava nel Green Rubin (-32%) e nel Red Rubin (-45%), mentre non vi erano variazioni significative nella conduttanza stomatica del Tigullio.

I dati ottenuti dimostrano che nella cv. Tigullio la riduzione dell'assimilazione della CO₂ non era attribuibile alla chiusura degli stomi che era invece evidente nella Green Rubin. La red Rubin non presentava alterazioni al processo fotosintetico attribuibili alla presenza di un eccesso di B nella soluzione nutritiva.

Nella **Tabella 7** sono riportati alcuni parametri determinati mediante la metodologia della fluorescenza della clorofilla *a*, che permette di valutare l'attività fotochimica del fotosistema II.

Tabella 7. Efficienza fotochimica massima (F_v/F_m) e attuale (Φ_{PSII}) del PSII e trasporto elettronico cloroplastico (ETR) in foglie dei genotipi di *Ocimum basilicum* sottoposti a due concentrazioni di boro nella soluzione nutritiva. Ogni valore indica la media di 3 repliche (\pm deviazione standard). Medie seguite da lettere uguali non sono significativamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a due vie con il genotipo e il trattamento con B come fonti di variabilità. L'assenza di lettere indica che l'interazione tra i due fattori di variabilità non è risultata statisticamente significativa.

F_v/F_m			
Trattamento	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
0,25 mg L ⁻¹	0,80 ($\pm 0,010$) a	0,81 ($\pm 0,000$) a	0,81 ($\pm 0,006$) a
25 mg L ⁻¹	0,73 ($\pm 0,032$) b	0,80 ($\pm 0,0001$) a	0,79 ($\pm 0,001$) a
Φ_{PSII}			
Trattamento	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
0,25 mg L ⁻¹	0,59 ($\pm 0,010$)	0,63 ($\pm 0,000$)	0,59 ($\pm 0,045$)
25 mg L ⁻¹	0,53 ($\pm 0,060$)	0,60 ($\pm 0,066$)	0,54 ($\pm 0,000$)
ETR ($\mu\text{mol elettroni m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			
Trattamento	Tigullio	Red Rubin	Green Rubin
0,25 mg L ⁻¹	159 ($\pm 4,5$)	170 ($\pm 2,5$)	155 ($\pm 9,0$)
25 mg L ⁻¹	142 ($\pm 12,6$)	159 ($\pm 7,5$)	144 ($\pm 3,5$)

La cv. Tigullio ha mostrato una significativa riduzione del rapporto F_v/F_m in condizioni di stress, riduzione che non si è verificata nei genotipi Green Rubin e

Red Rubin, i quali, anche in condizioni di stress, mostravano un rapporto F_v/F_m tipico di piante sane (0,80-0,83) come risulta dai lavori di Bjorkman et al. (1986). Per i dati relativi all'efficienza fotochimica del PSII in condizioni di luce (Φ_{PSII}) non risultava significativa l'interazione genotipo \times trattamento (vedi **Tab. 3**); tuttavia statisticamente significativo era il valore maggiore della Φ_{PSII} nel Red Rubin rispetto al Green Rubin e al Tigullio (**Tab. 3** e **Tab. 7**). Anche il singolo fattore B era significativo ed in tutti i genotipi la Φ_{PSII} si riduceva significativamente. Questi dati indicano che il PSII nella cv. Tigullio mostrava riduzioni che erano attribuibili a fotoinibizione che non si evidenziavano invece negli altri due genotipi.

Infine, nella **Tabella 7** sono riportati anche i risultati del trattamento a due concentrazioni di boro sul trasporto elettronico cloroplastico (ETR); anche in questo caso l'interazione non è risultata significativa anche se significativo era l'effetto dei singoli fattori di variabilità (**Tab. 3**). La cv. Red Rubin presentava i valori più alti di ETR e l'eccesso di B determinava una significativa riduzione dell'ETR in tutti e tre i genotipi.

I risultati relativi al processo fotosintetico evidenziano come la cv. Tigullio sia il genotipo che maggiormente ha risentito degli effetti negativi dell'eccesso di B come già riportato in letteratura (Landi et al., 2013, 2014). La cv. Red Rubin invece mostrava inalterato il processo fotosintetico in condizioni di eccesso di B. Caratteristico il comportamento del mutante Green Rubin, che presentava alterazioni nel processo fotosintetico simili al Tigullio ad indicare il ruolo importante degli antociani nella protezione dalle condizioni di stress.

5.5 Pigmenti

5.5.1 Antociani

Il contenuto di antociani è stato analizzato unicamente nel genotipo Red Rubin. Dalla media di tre repliche risultava che il contenuto di antociani nelle piante

sottoposte ad una concentrazione di boro di 0,25 mg L⁻¹ era di 2,56 µmol g⁻¹; questo valore diminuiva significativamente (-34,5%, P<0,01) a seguito del trattamento con eccesso di boro.

5.5.2 Clorofille e carotenoidi

Nella **Figura 18** vengono riportati i dati relativi al contenuto di clorofille e carotenoidi nei differenti genotipi sottoposti alle due concentrazioni di B nella soluzione nutritiva.

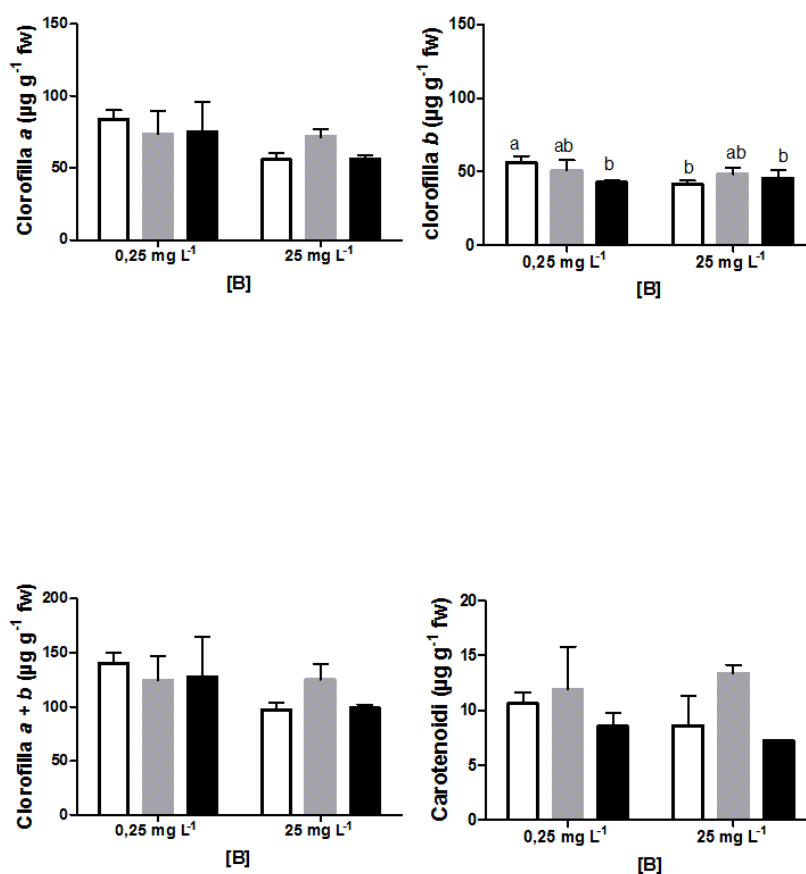


Figura 18. Contenuto di clorofilla *a*, clorofilla *b*, clorofille totali e carotenoidi delle piante di Tigullio (barra bianca), Red Rubin (barra grigia), Green Rubin (barra nera) sottoposte a due concentrazioni di boro. Ogni barra rappresenta la media di 3 repliche (\pm deviazione standard). Le lettere rappresentano medie statisticamente diverse (P=0,05) a seguito dell'ANOVA a due vie con genotipo e trattamento come fonti di variabilità. L'assenza di lettere indica che l'interazione tra i due fattori non è significativa.

In particolare, non risultavano differenze significative tra i genotipi sottoposti alla concentrazione ottimale di boro nel contenuto di clorofilla *a* (**Tab. 3** e **Fig. 18**) che diminuiva allo stesso modo a seguito del trattamento con eccesso di boro. Il contenuto di clorofilla *b* era invece significativamente più alto nella cv. Tigullio e nella Red Rubin coltivata in condizioni ottimali di B; il mutante Green Rubin presentava un valore più basso della Tigullio ma non rispetto alla cv. Red Rubin. L'eccesso di B induceva variazioni significative solo nella cv. Tigullio con una significativa riduzione.

5.6 Enzimi

Nella **Figura 19** è riportata l'attività degli enzimi ascorbato perossidasi e superossido dismutasi a seguito dei trattamenti a due concentrazioni di boro nella soluzione nutritiva.

Per i dati dell'ascorbato perossidasi l'interazione tra i fattori di variabilità è risultata significativa. È evidente come l'attività dell'enzima ascorbato perossidasi aumenti significativamente nel genotipo Tigullio a seguito del trattamento con eccesso di boro; nel genotipo Red Rubin che costituzionalmente presenta la maggior attività enzimatica, si riscontra una significativa riduzione dell'attività dell'ascorbato perossidasi a seguito del trattamento con eccesso di boro; nel genotipo Green Rubin invece, non si riscontrano differenze tra i due trattamenti. Nella **Figura 19** in basso è riportata l'attività dell'enzima superossido dismutasi, in questo caso, in tutti i genotipi vi è un calo dell'attività della SOD a seguito del trattamento con eccesso di boro, tale riduzione si mostra più evidente nel genotipo Red Rubin.

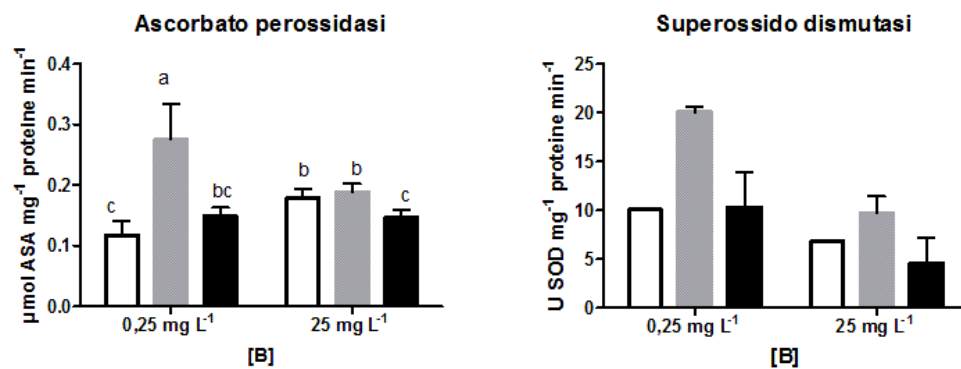


Figura 19. Attività degli enzimi ascorbato perossidasi e superossido dismutasi delle piante di Tigullio (barra bianca), Red Rubin (barra grigia), Green Rubin (barra nera) sottoposte a due concentrazioni di boro. Ogni barra rappresenta la media di 3 repliche (\pm deviazione standard). Le lettere rappresentano medie statisticamente diverse ($P=0,05$) a seguito dell'ANOVA a due vie con genotipo e trattamento come fonti di variabilità.

Capitolo 6: Discussione

Nei risultati dell'esperimento la concentrazione fogliare di boro nel controllo era simile in tutti i genotipi, pur con delle differenze significative tra il Tigullio e le altre due varietà (**Tab. 5**). Il trattamento con il boro incrementava notevolmente la concentrazione dell'elemento nei tessuti di tutti e tre i genotipi. L'incremento più elevato di B nei tessuti fogliari si evidenziava nella Green Rubin (18 volte la concentrazione del controllo), seguita dalla cv. Tigullio, nella quale la concentrazione di B era 13 volte superiore nelle foglie delle piante trattate rispetto ai controlli. L'aumento più contenuto di B nelle foglie era evidenziato nella cv. Red Rubin.

La cv. Tigullio era anche il genotipo che presentava la maggiore presenza di sintomi visibili di danno (**Figg. 13, 14 e 15**).

Osservando i dati della fotosintesi si nota che, a differenza degli altri genotipi, nel genotipo Red Rubin l'assimilazione netta di CO₂ non ha subito variazioni significative a seguito del trattamento con B; tale risultato è probabilmente legato alla presenza di antociani in quanto essi rappresentano la differenza più evidente rispetto al suo mutante che, come la cv. Tigullio presentava diminuzioni significativa della fotoassimilazione.

Considerando i dati della conduttanza stomatica, si nota come, in assenza di stress, la conduttanza stomatica del genotipo Red Rubin risultava essere quasi

doppia rispetto a quella determinata nelle foglie dei genotipi Tigullio e Green Rubin. Considerando che, nelle condizioni climatiche e nutritive in cui si trovavano le piante di controllo al momento della prova fossero ottimali per il loro sviluppo, gli stomi dei tre genotipi dovevano essere completamente aperti; la maggiore conduttanza stomatica al vapore acqueo rilevata nella cv. Red Rubin era legata alla sua caratteristica di pianta cresciuta all'”ombra”. Infatti la presenza degli antociani sull'epidermide determina sicuramente una riduzione dell'intercettazione della radiazione luminosa, come evidenziato anche dai minori tassi di attività fotosintetica rilevati in questo genotipo. La maggiore conduttanza stomatica di questo genotipo era associata anche ad un maggior ritmo di traspirazione (*dati non mostrati*).

Il risultato più evidente ottenuto in questo esperimento era la diversa sensibilità all'eccesso di B nella soluzione nutritiva della cv. Red Rubin rispetto alla cv. Tigullio come, peraltro già riportato in Landi et al. (2013). In realtà la elevata sensibilità era mostrata anche dal mutante Green Rubin che, a differenza della Red Rubin, non presenta gli antociani nell'epidermide delle foglie. Questo dato sembra confermare il ruolo chiave degli antociani nella protezione delle piante a vari stress, compreso quello indotto dall'eccesso di boro.

La riduzione dell'attività fotosintetica evidenziata nei genotipi Tigullio e Green Rubin era convalidata anche dai dati ottenuti dall'analisi della fluorescenza della clorofilla *a*. Infatti, nella cv. Tigullio il rapporto F_v/F_m si riduceva significativamente ad indicare alterazione nei processi fotochimici del PSII in questa cv. La riduzione dell'assimilazione era convalidata anche dalla riduzione del trasporto elettronico nei cloroplasti nella cv. Tigullio e Green Rubin.

In generale, l'eccesso di B induce una riduzione del contenuto in pigmenti fotosintetici, come riportato da Papadakis et al., (2004a,b), Eraslan et al. (2007 e 2008); Han et al. (2009) e Wang et al. (2011). In realtà in questo esperimento la

clorofilla *a* e *b* si riducevano solo nella cv. Tigullio mentre non si evidenziavano variazioni nella Red Rubin e nella Green Rubin.

In conclusione l'esperimento effettuato sembra sottolineare il ruolo positivo degli antociani nella resistenza agli stress abiotici. Purtroppo non appare ancora chiaro il meccanismo attraverso il quale queste molecole possano essere coinvolte nella resistenza allo stress e per tale motivo saranno necessari ulteriori studi finalizzati allo studio dei meccanismi molecolari e biochimici coinvolti.

Capítulo 7: BIBLIOGRAFIA

- Amin S.A., Kupper F.C., Green D.H., Harris W.R., Carrano C.J. (2007)**
Boron binding by a siderophore isolated from marine bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of American Chemical Society* 129: 478–479
- Brown P.H., Hu H. (1996)** Phloem mobility of species dependent evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Annals of Botany* 77: 497–505
- Cervilla L.M., Blasco B., Ríos J.J., Rosales M.A., Rubio-Wilhelmi M.M., Rodríguez E.S., Romero L., Ruiz J.M. (2009)** Response of nitrogen metabolism to boron toxicity in tomato plants. *Plant Biology* 11: 671-677.
- Chen X., Schauder S., Potier N. (2002)** Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545–549
- Dembitsky V.M., Smoum R., Al-Quntar A., Ali H.A., Pergament I., Srebnik M. (2002)** Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science* 163: 931–942
- Dhindsa, Matowe (1981).** Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32: 79-91.

- Diwan J.J. (2007)** Membrane transport, *Molecular Biochemistry-I*, Copyright 1998–2007 by Joyce J. Diwan.
- Dubyak G. (2004)** Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Advances in Physiology Education* 28:143–154
- Eraslan F., Inal A., Gunes A., Alpaslan M. (2007a.)** Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113: 120-128
- Eraslan F., Inal A., Pilbeam D.J., Gunes A. (2008)** Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. CV. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation* 55: 207-219
- Eraslan F., Inal A., Savastur O., Gunes A. (2007b)** Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114: 5-10
- Foyer C., Noctor G. (2011).** Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub1. *Plant Physiology* 155: 2-18
- Han S., Tang N., Jiang H., Yang L.T., Lee Y. (2009)** CO₂ assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress. *Plant Science* 176: 143-153
- Havlin J., Tisdale S., Beaton J., Nelson W. (2007)** In soil fertility and fertilizers. *Prentice Hall* (India), New Delhi
- Javanmardi J., Khalighi A., Kashi A., Bais H., Vivianio J. (2002).** Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5878-5883
- Keren R., Bingham F. (1985)** Boron in soil and water. *Advances in Soil Science* 1:230–276

- Landi M., Degl’Innocenti E., Pardossi A., L. Guidi (2012)** Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 7: 255-270
- Landi M., Guidi L., Pardossi A., Tattini M., Gould K. S. (2014)** Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Planta* 240: 941–953
- Landi M., Pardossi A., Remorini D., Guidi L. (2013)** Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. *Environmental and Experimental Botany* 85: 64– 75
- Landi M., Remorini D., Pardossi A., Guidi L. (2013)** Purple versus green-leaved *Ocimum basilicum*: Which differences occur with regard to photosynthesis under boron toxicity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 942-951
- Lee J., Scagel C. (2009).** Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry* 115: 650-656
- Marshner H (1995)** Mineral nutrition of higher plants. *Academic, London*,: 313–323
- Matsunaga T., Ishii T., Matsumoto S., Higuchi M., Darvill A., Albersheim P., O’Neill M.A. (2004)** Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II *Pteridophytes, Lycophytes* and *Bryophytes*. Implication for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology* 134: 339–351
- Mitra G. N. (2015)** Regulation of Nutrient Uptake by Plants. *Springer*
- Miwa K., Fujiwara T. (2009)** Boron transport in plants: coordinated regulation of transporters. *In: The proceedings of international plant nutrition colloquium XVI.* UC, Davis
- Miwa K., Fujiwara T. (2010)** Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany* 105: 1103–1108

- Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T. (2007)**
Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318: 1417
- Nable R., Bannuelos G., Paull G. (1997)** Boron toxicity. *Plant Soil* 193:181–198
- O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. (2004)** Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 55: 109–139
- Ochiai K., Uemura S., Shimizu A., Okumoto Y., Matoh T. (2008)** Boron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), Quantitative trait locus (QTL) analysis of tolerance to boron toxicity. *Theoretical and Applied Genetics* 117(1):125–133
- Oerth J.J., Roth J.A. (1969)** Boron nutrition of sugar beet, cotton and soybean. *Agron Journal* 61:191–195
- Papadakis I., Dimassi K.N., Bosabalidis A.M., Therios I.N., Patakas A. (2004b.)** Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of 'Navelina' orange plants grafted on two rootstocks. *Environmental and Experimental Botany* 51:247-257
- Papadakis I.E., Dimassi N., Bosabalidis A.M., Therios I.N., Patakas A., Giannakoula A. (2004a.)** Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science* 166, 539-547
- Pardossi A., Romani M., Carmassi G., Guidi L., Landi M., Incrocci L., Maggini R., Puccinelli M., Vacca W., Ziliani M. (2015)** Boron accumulation and tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) with green or purple leaves. *Plant Soil* 395: 375–389
- Quigley F., Rosenberg J.M., Shachar-Hill Y., Bohnert H.J. (2002)** From genome to function: The *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology* 3(1): research0001.1 research0001.17

- Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D., Lohmann J. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37:501–506
- Shan, B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749-7759
- Surveswaran, S., Cai Y.Z., Corke H., Sun M., (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102: 938-953
- Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobayashi M., Gajdos Z., Miwa K., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T. (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* 420:337–340
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wirén N., Fujiwara T. (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18:1498–1509
- Tanaka M., Wallace I.S., Takano J., Roberts D.M., Fujiwara T. (2008) NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2860–2875
- Tesi R. (2010) Orticoltura Mediterranea Sostenibile. *Pàtron Editore*
- USDA (1954) Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, *agriculture handbook no.60*, US salinity laboratory, US Department of Agriculture, Washington, DC
- Verkman A. S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science* 118:3225-32

- Wallace I.S., Roberts D.M. (2005)** Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44:16826–16834
- Wang J.Z., Tao S.T., Qi K.J., Wu J., Wu H.Q. (2011)** Changes in photosynthetic properties and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity. *African Journal of Biotechnology* 10: 19693-19700
- Wise, R.R., Naylor A.W. (1987).** Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology* 83: 278-282
- Woods W.G. (1996)** Review of possible boron speciation relating to its essentiality. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 9: 153–163
- Zheng W., Wang S.Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165-5170